

# **Process for preparing diglycerides containing in position 2 a polyunsaturated fatty acid residue, and the products obtained**

Patent Number: FR2599382  
 Publication date: 1987-12-04  
 Inventor(s): WOLFF ROBERT  
 Applicant(s): INST CORPS GRAS ITERG (FR)  
 Requested Patent: ☐ FR2599382  
 Application Number: FR19860007741 19860529  
 Priority Number(s): FR19860007741 19860529  
 IPC Classification:  
 EC Classification: C12P7/64  
 Equivalents:

## **Abstract**

The present invention relates to a process for preparing diglycerides having, in position 2, a polyunsaturated fatty acid residue, characterised in that: there is used as starting material a dispersion, in water, of phospholipid(s) extracted from animal tissue; the said suspension is treated with a salt of a divalent cation so as to cause flocculation of the said phospholipid; there is added to the medium obtained a quantity of phospholipase C corresponding to about 0.1 phospholipase unit per 1.5 mg of flocculated phospholipid; the precipitate obtained is filtered and the filtered solid product is recovered; it also relates to the products obtained using this process.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 599 382**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
(21) N° d'enregistrement national : **86 07741**  
(51) Int Cl\* : C 12 P 7/64; C 07 C 69/003.

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

(22) Date de dépôt : 29 mai 1986.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : BOPI « Brevets » n° 49 du 4 décembre 1987.

(50) Références à d'autres documents nationaux appa-  
rentés :

(71) Demandeur(s) : *INSTITUT DES CORPS GRAS - ITERG,*  
*Centre technique industriel régi par la loi du 22 juillet*  
*1948. — FR.*

(72) Inventeur(s) : Robert Wolff.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Beau de Loménie.

(54) Procédé de préparation de diglycérides contenant en position 2 un reste d'acide gras poly-insaturé, et produits obtenus.

(57) La présente invention concerne un procédé de prépara-  
tion de diglycérides ayant, en position 2, un reste d'acide gras  
poly-insaturé, caractérisé en ce que : on utilise comme produit  
de départ une dispersion, dans l'eau, de phospholipide(s) ex-  
trait de tissus animaux; ladite suspension est traitée par un sel  
de cation divalent de façon à provoquer une floculation dudit  
phospholipide; on ajoute au milieu obtenu une quantité de  
phospholipase C correspondant à environ 0,1 unité de phos-  
pholipase pour 1,5 mg de phospholipide floculé; on filtre le  
précipité obtenu et on recueille le produit solide filtré; elle  
concerne également les produits obtenus selon ce procédé.

FR 2 599 382 - A1

Procédé de préparation de diglycérides contenant en position 2 un  
reste d'acide gras poly-insaturé, et produits obtenus.

La présente invention concerne un procédé de préparation de diglycérides contenant en position 2 du glycérol, un acide gras poly-insaturé (contenant de 2 à 6 doubles liaisons), elle concerne également les produits obtenus par ce procédé.

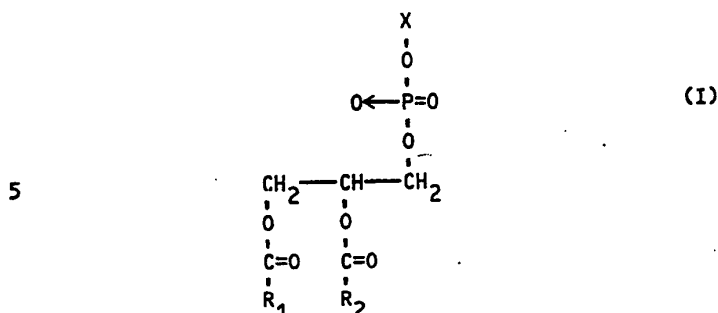
Il est difficile d'obtenir, par synthèse chimique, des produits d'estérification du glycérol dans lesquels un acide gras poly-insaturé est positionné uniquement en position 2 de la molécule de glycérol. Or, on sait que de tels produits dans lesquels l'acide gras insaturé peut être, par exemple, de l'acide dihomog-  
linoléique (20:3 n-6), de l'acide arachidonique (20:4 n-6), de l'acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3) ou de l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) peuvent présenter un grand intérêt biologique.

La présente invention décrit un procédé permettant l'obtention de ces produits par voie enzymatique. Le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que :

- on utilise, comme produit de départ, un mélange de phospholipides extrait de tissus animaux, ces phospholipides étant dispersés dans de l'eau,
- la suspension obtenue est traitée par un sel de cation divalent de façon à provoquer une floculation des phospholipides en agrégats macroscopiques,
- on ajoute au milieu obtenu une quantité de phospholipase C correspondant à environ 0,1 unité pour 1,5 mg de phospholipides,
- le précipité obtenu est filtré sur papier, et on recueille, dans le papier, des diglycérides dont la position 2 est estérifiée par un acide gras poly-insaturé.

Le produit de départ est un mélange de phospholipides extrait de tissus animaux par des méthodes connues, par exemple par macération des tissus broyés dans des solvants convenables tels que chloroforme-méthanol ou hexane-isopropanol.

Les phospholipides, qui peuvent être séparés des lipides apolaires par précipitation à l'acétone, sont des composés que l'on peut représenter schématiquement par la formule suivante :



dans laquelle

- 10 X peut être de la choline, de l'éthanolamine, de la sérine, de l'inositol ou du phosphatidyl-glycérol,  
 R<sub>1</sub>, de façon très générale, est un acide gras saturé tel qu'acide palmitique ou stéarique, ou un acide gras monoinsaturé tel qu'acide oléique,  
 15 R<sub>2</sub> est un acide gras insaturé, dont la plus grande proportion est constituée d'acides gras poly-insaturés.

On conçoit que selon le tissu animal utilisé comme source d'extraction des phospholipides, et éventuellement selon le procédé mis en oeuvre pour cette extraction, les produits de  
 20 départ décrits par la formule (I), qui sont presque toujours des mélanges, auront des compositions différentes.

Dans la présente invention, le mot diglycéride signifie donc soit, exceptionnellement, un produit chimique pur, soit, le plus souvent, un mélange.

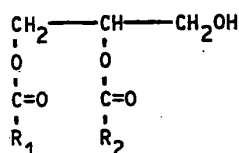
25 Dans une première opération, les phospholipides sont mis en suspension dans de l'eau par agitation intense ; la dispersion est favorisée par l'utilisation d'ultrasons.

Dans une deuxième opération, la suspension obtenue est traitée par un sel de cation divalent (Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>)  
 30 jusqu'à apparition d'un début de floculation. L'expérience prouve qu'on utilise de l'ordre de 1 à 5 mmol du cation divalent pour 250 mg de phospholipide.

C'est ensuite sur la suspension floculée, ou en cours de floculation, que l'on réalise la réaction enzymatique. Cette  
 35 réaction d'hydrolyse libère un diglycéride et est réalisée à

l'aide d'une phospholipase C, produit connu excrété par certains micro-organismes (*Bacillus cereus*, par exemple) dans un milieu de culture convenable. Cette réaction enzymatique se déroule très rapidement (durée de l'ordre de 5 à 15 minutes) à température  
 5 ordinaire ou proche de l'ordinaire (entre environ 15 et 50°C) et à pH compris entre 6,5 et 8. On utilise environ 0,1 unité d'enzyme pour traiter 1,5 mg de phospholipides.

A la fin de la réaction, on obtient un précipité que l'on peut filtrer et qui se trouve être constitué essentiellement  
 10 par le diglycérade (ou un mélange de diglycérades), de formule :



15 ainsi que par les phospholipides non-substrats de la phospholipase C.

Dans le filtrat, on trouve l'enzyme utilisé qui peut être récupéré, régénéré et réutilisé.

On notera que le procédé, selon l'invention, permet en outre, du fait de la présence, en fin de réaction, de phospholipides  
 20 non hydrolysés, de réaliser, en même temps que la préparation de diglycérades, un fractionnement du produit de départ et de récupérer certaines catégories de phospholipides. Par exemple, la phospholipase C de *Bacillus cereus* n'hydrolyse que très peu le phosphatidyl-  
 inositol et les cardiolipides, et pas du tout la sphingomyéline. Ces  
 25 phospholipides sont aisément séparés des diglycérades par précipitation dans l'acétone.

Les diglycérades obtenus peuvent être utilisés sous cette forme, ou être transformés en monoglycérades ayant en position 2 un  
 acide gras insaturé ou en triglycérades ayant en position 2 un acide  
 30 gras insaturé.

L'exemple non limitatif suivant illustre l'invention.

10 g de foie de porc frais sont broyés dans un mélange de chloroforme et de méthanol et les lipides totaux extraits par la méthode classique de Bligh et Dyer. L'extrait lipidique brut renferme

250 mg de lipides. Après précipitation à l'acétone, on recueille, par filtration, 230 mg de phospholipides pratiquement purs. Le solvant évaporé, ces phospholipides sont dispersés dans de l'eau à l'aide d'ultrasons et un sel d'ion divalent ( $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{MgCl}_2$ ), en solution lui-même dans l'eau, est ajouté. Le pH de la solution est ajusté à 7,5 et la phospholipase de *Bacillus cereus* est ajoutée (16 unités).

Après 15 min d'incubation à 35°C, en maintenant le pH à 7,5, la suspension est filtrée sur papier : le résidu resté sur le filtre renferme 150 mg de diglycérides, dont plus de 95 % sont de la configuration 1,2. Les phospholipides n'ayant pas subi l'hydrolyse enzymatique (cardiolipides, phosphatidyl-inositol et sphingomyéline) représentent environ 50 mg et sont éliminés par précipitation dans l'acétone. Le tableau I donne la composition en acides gras des diglycérides obtenus, en comparaison de celle des phospholipides de départ :

Tableau I

Composition en pourcentage des acides gras des phospholipides avant hydrolyse enzymatique par la phospholipase C et des diglycérides obtenus.

20

25

30

Acide gras	Phospholipides	Diglycérides
16:0	18,7	20,0
18:0	20,0	26,1
18:1	10,7	12,4
18:2 n-6	12,5	13,3
20:3 n-6	1,2	1,1
20:4 n-6	15,6	14,5
20:5 n-3	0,6	0,9
22:5 n-3	2,8	2,6
22:6 n-3	1,2	1,2

A titre indicatif, près de 30 % des diglycérides obtenus contiennent de l'acide arachidonique (20:4 n-6) en position 2.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de diglycérides ayant, en position 2, un reste d'acide gras poly-insaturé, caractérisé en ce que :

- 5                   - on utilise comme produit de départ une dispersion, dans l'eau, de phospholipide(s) extrait de tissus animaux,  
                  - ladite suspension est traitée par un sel de cation divalent de façon à provoquer une floculation dudit phospholipide,  
                  - on ajoute au milieu obtenu une quantité de phospho-  
10 lipase C correspondant à environ 0,1 unité de phospholipase pour 1,5 mg de phospholipide floculé,  
                  - on filtre le précipité obtenu et on recueille le produit solide filtré.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la suspension de départ est obtenue par agitation intense du mélange phospholipide-eau, ladite agitation étant réalisée de préférence par ultrasons.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ledit cation divalent est choisi parmi le  $\text{Ca}^{++}$ , le  $\text{Mg}^{++}$  et le zinc $^{++}$  et que l'on utilise de 1 à 5 mmol environ  
20 de cation divalent pour 250 mg de phospholipide.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la réaction avec la phospholipase C est effectuée entre 15 et 50°C environ et a un pH compris entre 6,5 et 8 environ.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la phospholipase C est récupérée dans le filtrat résultant de l'étape de séparation, par filtration, du diglycéride obtenu.

6. Diglycérides comportant, en position 2, un reste d'acide gras poly-insaturé, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus selon le procédé de l'une des revendications 1 à 5.

7. Diglycérides selon la revendication 6, caractérisés en ce que le radical poly-insaturé en position 2 est un radical provenant d'un acide tel que l'acide dihom- $\gamma$ -linoléique, de l'acide arachidonique, de l'acide eicosapentaénoïque ou de l'acide docosahexaénoïque.

8. Utilisation des diglycérides selon l'une des revendications 6 et 7, pour la préparation de monoglycérides présentant en position 2 un acide gras poly-insaturé ou de triglycérides présentant, en position 2, un acide gras poly-insaturé.